

蛍光寿命相関分光法による生体高分子の構造揺らぎの観測：

DNAヘアピン構造の形成ダイナミクス

(理研・田原分子分光) ○石井 邦彦, 田原 太平

【序】我々は蛍光性プローブ分子の蛍光寿命の不均一性を通して複雑分子系の自発的な構造揺らぎを観測するための新しい相関分光法の開発を行っている[1,2]。これまでに、蛍光寿命の重みを付けた相関関数を利用して静的な蛍光寿命の不均一性を検出できることを報告した(蛍光寿命相関分光法) [1]。本研究では、この方法を生体高分子の自発構造揺らぎの問題に適用し、時間変化する蛍光寿命の不均一性＝蛍光寿命の時間揺らぎを初めてとらえることに成功した。今後、蛍光寿命というパラメータが持つ情報を利用して生体高分子の構造揺らぎについてのさらなる知見を得る有力な手段となる可能性がある。

【実験】蛍光相関関数の測定はフェムト秒パルスレーザー(Coherent Mira 900-F)と時間相関光子計数ボード(Becker & Hickl SPC-140)を組み合わせた自作の蛍光相関分光計で行った。蛍光寿命の重みを付けた相関関数 $G_L(\Delta T)$ は時刻 T での蛍光強度 $I(T)$ と蛍光寿命 $t(T)$ を使って

$$G_L(\Delta T) = \frac{\langle t(T)I(T)t(T+\Delta T)I(T+\Delta T) \rangle}{\langle t(T)I(T) \rangle^2}$$

と定義される。この $G_L(\Delta T)$ と通常の蛍光強度相関関数

$$G_I(\Delta T) = \frac{\langle I(T)I(T+\Delta T) \rangle}{\langle I(T) \rangle^2}$$

を同時測定して比較することで、並進拡散信号の寄与を除いた形で蛍光寿命の揺らぎを議論することができる[1]。

測定対象としては、ヘアピン構造を取る一本鎖 DNA オリゴヌクレオチドを使用した(図1)。この分子は塩基対を形成しないループ部および相補的な塩基配列からなるステム部を持ち、一般の DNA/RNA のループ構造形成や相補的な二本鎖形成の初期過程を理解するための単純なモデル化合物である。このオリゴヌクレオチドの両末端を FRET ペアとして機能する蛍光色素で標識し、FRET ペア間の共鳴エネルギー移動効率の変化を測定することでヘアピン構造の形成・解離をモニターすることができる。

本研究では FRET ペアのドナー側の蛍光寿命の揺らぎを $G_L(\Delta T)$ として測定した。FRET 標識 DNA オリゴヌクレオチドはリアルタイム PCR 用プローブとして市販されているものを利用した (1:6-FAM-5'-TTAACC(T)₁₈GGTT-3'-TAMRA、北海道システムサイエンス)。

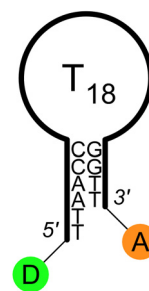


図1 1の構造。

【結果と考察】図2に **1** の定常蛍光スペクトルの塩濃度依存性を示す。塩濃度の上昇に伴いヘアピン構造の解離平衡が相補鎖形成側に移動し、ドナー蛍光強度が減少している。このドナー蛍光の波長 505–540 nm の成分を切り出し、 $G_L(\Delta T)$, $G_I(\Delta T)$ を測定した (図3a, NaCl 濃度 0.5 M)。その結果、これら2つの相関関数の間には明らかな差異が見られ、蛍光寿命の不均一性の存在が示された。並進拡散信号の寄与を除くためにこれらの相関成分の比を取ったもの (図3b) を見ると、約 100 マイクロ秒の遅延時間で比の値が~1.3 から~1.5 へと明確に遷移していることが分かる。これは、ヘアピン構造の何らかの変化によりドナー - アクセプター間距離が約 100 マイクロ秒の時定数で揺らいでいることを示唆している。DNAヘアピン構造の形成ダイナミクスは2状態的ではなく中間状態が存在するという報告もあり[3]、蛍光寿命を利用する我々の方法では FRET 効率を通して揺らいでいる分子の構造についての情報も得られることから、今回の測定結果が反応モデルの決定に利用できるのではないかと考えている。講演では観測された揺らぎと遅い時間まで残る不均一性の帰属のために調べている塩基配列依存性の結果についても議論する。

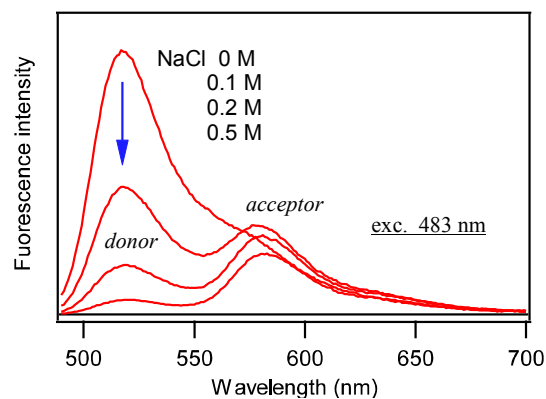


図2 **1** の定常蛍光スペクトルの塩濃度依存性。

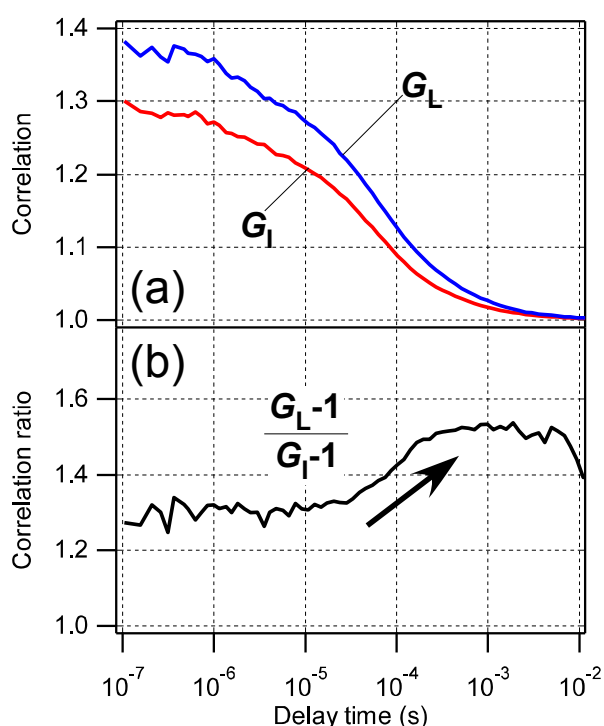


図3 **1** の蛍光相関測定結果。(a)通常相関関数 (G_I) と蛍光寿命重み付き相関関数 (G_L)。 (b)相関関数の比。

[1] 石井邦彦・田原太平, 日本化学会第 89 春季年会, 2E5-46(2009); K. Ishii and T. Tahara, “Resolving inhomogeneity using lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy”, submitted for publication.

[2] 石井邦彦・田原太平, 第3回分子科学討論会, 4P091(2009).

[3] A. V. Orden and J. Jung, Biopolymers 89, 1 (2008).